

聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳技术分析 1 只死亡野生川金丝猴胃肠道菌群多样性

曾 燕¹ 牛李丽^{2*} 邓家波² 王 强² 余建秋² 李 杨¹ 周梦佳³ 徐 帅¹ 林奕岑¹
曾 东^{1**} 倪学勤^{1**}

(1.四川农业大学动物医学院动物微生态研究中心, 成都 611130; 2.成都动物园, 成都 610081; 3.四川省畜牧科学研究院, 成都 610066)

摘 要:本试验旨在对 1 只死亡野生川金丝猴的胃肠道菌群多样性及其克隆测序条带的系统进化树进行分析。取死亡野生川金丝猴胃肠道内容物, 进行聚合酶链式反应 (PCR) -变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 分析, 结合条带的克隆测序、聚类分析和主成分 (PCA) 分析检测菌群多样性并构建系统进化树。结果显示: 1) 野生川金丝猴整个胃肠道栖息着大量细菌, 且来自胃、小肠的样品聚为一大簇, 来自大肠的样品聚为一簇, 而来自粪便的样品单独聚为一簇。2) 从 DGGE 图谱上共回收 18 个条带, 细菌种类鉴定主要是 5 个菌门, 分别为变形菌门 (Proteobacteria, 38.89%)、厚壁菌门 (Firmicutes, 22.22%)、拟杆菌门 (Bacteroidetes, 5.56%)、放线菌门 (Actinobacteria, 5.56%)、疣微菌门 (Verrucomicrobia, 5.56%) 和不可培养菌 (uncultured bacterium, 22.22%)。其中, 变形菌门和厚壁菌门分布于整个胃肠道。3) 菌群的系统进化树分析表明, 仅有 1 种不可培养菌与已鉴定的粪肠球菌进化分类相似, 而其他不可培养菌与已知的菌种进化分支差异较大, 说明在野生川金丝猴的胃肠道中仍有大量的菌群信息未被鉴定。结果提示, 本试验测定的 1 只死亡野生川金丝猴的胃肠道优势菌群为变形菌门, 菌群多样性随着胃肠道由前至后的顺序呈现高-低-高的趋势。

关键词: 川金丝猴; 胃肠道菌群; PCR-DGGE; 克隆测序; 系统进化树

中图分类号: S826 **文献标识码:** A **文章编号:**

川金丝猴(*Rhinopithecus roxellana*)别名仰鼻猴, 属哺乳纲、灵长目、仰鼻猴属^[1], 是我国特有的国家一级保护动物, 主要分布于四川、甘肃、陕西和湖北等地^[2], 其外形优美且种群稀少, 是典型的森林树栖动物, 群栖于高山密林中, 其食性复杂, 但均以植物性食物为主^[3]。随着人类活动的增多, 川金丝猴的栖息地受到严重破坏, 加上环境因素以及少量天敌的影响, 其数量不断减少。而四川南坪白河、陕西周至和湖北神农 3 个国家级金丝猴自然保护区的建立^[4]及人工饲养繁育使川金丝猴的繁殖和种群逐渐得以恢复。并且, 胃肠

收稿日期: 2017-07-14

基金项目: 成都大熊猫繁育研究基金会项目 (CPF2015-06); 国家自然科学基金 (31672318)

作者简介: 曾 燕 (1987-), 女, 四川内江人, 博士研究生, 从事动物微生态研究。E-mail: zengyan88@stu.sicau.edu.cn

*同等贡献作者

**通信作者: 曾 东, 教授, 博士生导师, E-mail: zend@sicau.edu.cn; 倪学勤, 教授, 博士生导师, E-mail: xueqinni@foxmail.com

道微生物的研究和利用也是目前野生动物繁殖及种群保护的重要措施^[5]。肠道微生物组成及功能与宿主的消化、免疫应答和生理功能密切相关^[6-7]。近年来,已有研究初步报道了川金丝猴部分肠段及粪便菌群结构及组成等信息^[3,8-9],但其整个胃肠道菌群的信息仍处于未知状态。因此,研究整个胃肠道菌群结构及组成对川金丝猴的饲养繁殖及种群保护具有重要的指导意义。

聚合酶链式反应(PCR)-变性梯度凝胶电泳(DGGE)技术是近年来在菌群多样性方面应用最为广泛的分子生物学技术,它为菌群结构及组成的研究提供了强有力的保障^[10]。因此,本试验拟运用 PCR-DGGE 技术研究 1 只死亡野生川金丝猴胃肠道(胃、十二指肠、空肠、回肠、盲肠、结肠、直肠和粪便)菌群的多样性,并对主要条带进行克隆测序后构建系统发育树,以期丰富川金丝猴胃肠道菌群信息,为其饲养、健康生长及种群保护提供科学的指导。

1 材料与方法

1.1 样品采集

2016 年 3 月,四川省绵阳市平武县救护站在野外发现 1 只消瘦、濒临死亡的野生老龄雌性川金丝猴(18 岁),并送至成都动物园救治,对其补充营养及补液(5%葡萄糖、生理盐水和碳酸氢钠),期间其未进食任何食物,收集其粪便样品,救治无效死亡,解剖后脏器病理观察仅见心脏有陈旧性梗死灶并伴有心肌纤维化和钙化,判断可能死于心脏病。同时收集胃肠道内容物样品(胃、十二指肠、空肠、回肠、盲肠、结肠和直肠)至灭菌 2 mL 离心管中,液氮速冻后-80 °C 保存备用。

1.2 总 DNA 提取

采用 QIAamp® DNA Stool Mini Kit 提取样品细菌总 DNA,溶于 200 µL 的 Buffer AE 溶液中保存,置-20 °C 备用。

1.3 细菌总 DNA 的 16S rDNA V3 区 PCR 扩增

以样品细菌总 DNA 为模板,使用大肠杆菌通用扩增细菌 16S rDNA V3 区序列^[10]。上游引物为 5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGCCTACGGGA GGCAGCAG-3'(带下划线部分为“GC”夹子);下游引物为 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'。PCR 扩增体系(50 µL):模板 DNA 2 µL,上、下游引物(10 µmol/L)各 2 µL,2×Taq Master Mix 25 µL,补双蒸水(ddH₂O)至 50 µL。PCR 扩增程序:94 °C 预变性 4 min;94 °C 变性 30 s,58 °C 复性 30 s,72 °C 延伸 2 min,30 个循环;最终 72 °C 延伸 10 min。采用 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

1.4 PCR 产物的 PCR-DGGE 指纹图谱分析及条带克隆测序

采用 Bio-Rad Dcode 系统对 PCR 产物 (10 μ L) 进行 DGGE 分析, 凝胶梯度为 35%~65%, 在 1 \times TAE 缓冲液中 100 V、60 $^{\circ}$ C 条件电泳 16 h。用硝酸银染色法对 DGGE 结果显色, 并用 Bio-Rad[®] GS800 Calibrated Densitometer 对结果扫描成像。切胶回收 DGGE 指纹图谱上的共性条带和特异性条带, 用 Gel Extraction Kit (美国 Omega 公司) 回收条带, 并用 PMD19-T 载体和大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞克隆筛选目的条带, 阳性克隆送至上海生物工程有限公司进行测序。测定序列在 GenBank 数据库中进行比对, 下载亲缘关系最近的细菌或克隆序列, 用 MEGA 软件分析并获得序列的进化树。

1.5 数据分析

用 Excel 2013 对 DGGE 指纹图谱的多样性进行统计分析, 用 SPSS 19.0 软件进行主成分分析 (PCA), 用 NTSYS 2.1 软件进行聚类分析, 用 MEGA 软件对克隆测序结果进行系统进化树分析。其中, 多样性指标的计算公式如下:

$$H = -\sum(p_i)(\ln p_i);$$

$$E = H/H_{\max};$$

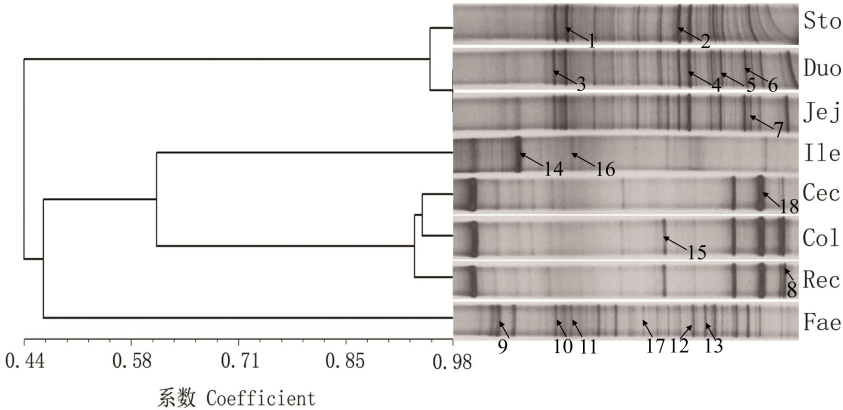
$$R = s。$$

式中: H 为香农-威纳指数 (Shannon-Wiener index), 用于表示多样性指数 (diversity index); p_i 为物种 i 的相对丰度比例; E 为均匀度 (evenness); R 为丰富度 (richness); s 为样品在 DGGE 的条带数。

2 结果与分析

2.1 野生川金丝猴胃肠道菌群 PCR-DGGE 指纹图谱的聚类分析

野生川金丝猴胃肠道样品 16S rDNA PCR 产物的 DGGE 检测结果如图 1 所示。DGGE 图谱的非加权分组平均 (UPGMA) 法分析显示, 来自胃、十二指肠和空肠的样品聚为一大簇, 其相似性系数为 0.97; 来自回肠、盲肠、结肠和直肠的样品同样聚为一簇, 其相似性系数为 0.60; 而来自粪便的样品则单独聚为一簇, 与其他胃肠道样品的相似性系数仅为 0.45。DGGE 图谱条带结果显示, 野生川金丝猴胃肠道栖息着大量细菌, 且栖息在各部位的细菌种类和数量存在一定差异。所有胃肠道样品共分离出 52 个条带。其中, 粪便样品中的细菌种类最丰富, 条带数为 32; 其次是胃和小肠 (十二指肠和空肠) 样品, 条带数分别为 27、27 和 28; 而大肠 (回肠、盲肠、结肠和直肠) 样品中的细菌种类相对较少, 条带数分别为 13、13、16 和 15。这些部位菌群组成差异的产生可能与宿主健康状态或其胃肠道各部位的消化功能及细菌定植差异相关。



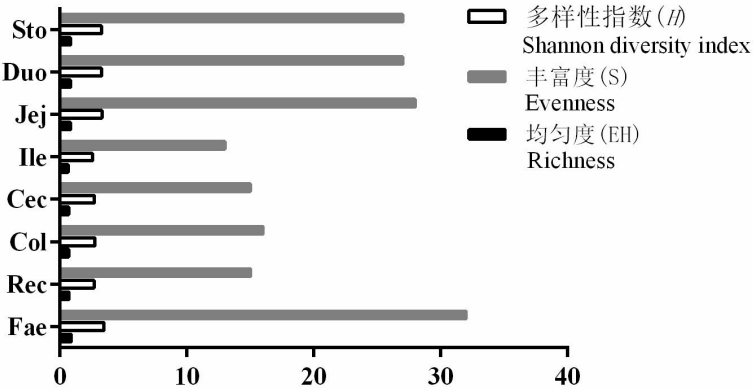
86

87 Sto、Duo、Jej、Ile、Cec、Col、Rec 和 Fae 分别为野生川金丝猴的胃、十二指肠、空肠、
88 回肠、盲肠、结肠、直肠和粪便样品，带箭头的数字（1~21）为条带编号。下图同。

89 Sto, Duo, Jej, Ile, Cec, Col, Rec and Fae mean bacteria from stomach, duodenum, jejunum,
90 ileum, cecum, colon, rectum, and faeces of Wild *Rhinopithecus roxellanae*, respectively. Numbers
91 (1 to 21) with arrow are the bands No. The same as below.

92 图 1 胃肠道菌群 PCR-DGGE 图谱及聚类分析
93 Fig.1 PCR-DGGE profiles and cluster analysis of bacteria in gastrointestinal tract
94 2.2 野生川金丝猴胃肠道菌群PCR-DGGE图谱的多样性分析

95 野生川金丝猴胃肠道菌群的多样性分析结果如图 2 所示。由图可知，胃肠道各样品菌群的
96 多样性存在差异。粪便菌群的多样性指数、均匀度和丰富度最高，分别为 3.47、0.88 和
97 32.00；胃、十二指肠和空肠菌群的多样性指数、均匀度和丰富度较高，分别为 3.30、0.83、
98 27.00 和 3.30、0.83、27.00 及 3.33、0.84、28.00；而大肠菌群的多样性指数、均匀度和丰富
99 度较低，其中，回肠菌群的多样性指标最低，分别为 2.56、0.65 和 13.00。随着胃肠道部位
100 按照由前往后顺序推移，菌群多样性呈现出高-低-高的趋势，这与前面 DGGE 图谱聚类分析
101 结果一致。



102

图 2 胃肠道菌群的多样性指数、均匀度及丰富度

Fig.2 Diversity index, evenness and richness of bacteria in gastrointestinal tract

2.3 胃肠道菌群PCR-DGGE图谱的主成分分析

对野生川金丝猴胃肠道DGGE图谱进行主成分分析后发现，菌群结构及组成不同的样品在主成分分析中的分布与DGGE图谱的聚类分析结果一致，见图3。结果表明，主成分因子1和2的贡献率分别为42.90%和29.79%，共同将野生川金丝猴的胃肠道菌群区分为3个聚类。其中，胃、十二指肠和空肠的菌群聚类在一起，回肠、盲肠、结肠和直肠的菌群聚类在一起，而粪便菌群单独分离开。这表明野生川金丝猴胃肠道相邻肠段的菌群结构及组成相似性高，而作为肠段末端的粪便样品与其他样品间存在一定差异。

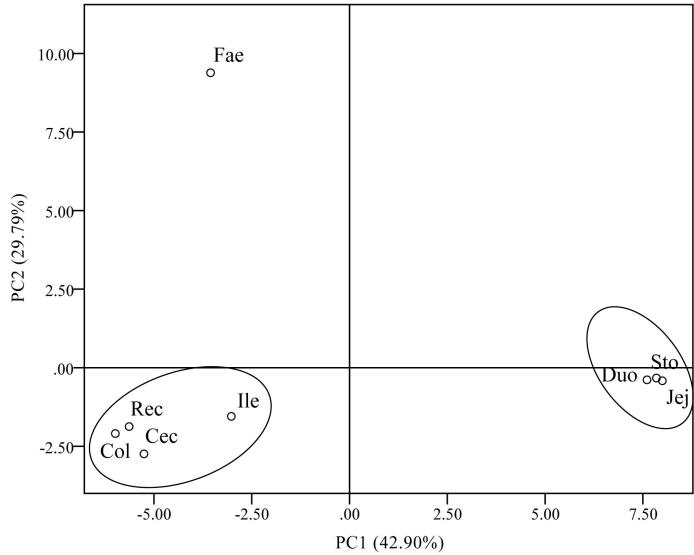


图 3 胃肠道菌群 PCR-DGGE 图谱的主成分分析

Fig. 3 PCA of PCR-DGGE profiles of bacteria in gastrointestinal tract

2.4 胃肠道菌群 PCR-DGGE 图谱主要条带的序列检测

在野生川金丝猴胃肠道菌群的 PCR-DGGE 图谱上共回收了 18 个条带(图 1 箭头所指 1~18)，测序结果在 NCBI 上进行亲缘关系比对，结果如表 1 所示。经鉴定，野生川金丝猴胃肠道细菌主要来自 5 个菌门，分别是变形菌门(Proteobacteria, 38.89%)、厚壁菌门(Firmicutes, 22.22%)、拟杆菌门 (Bacteroidetes, 5.56%)、放线菌门 (Actinobacteria, 5.56%)、疣微菌门 (Verrucomicrobia, 5.56%) 和不可培养菌 (uncultured bacterium, 22.22%)。其中，变形菌门和厚壁菌门分布于整个胃肠道，拟杆菌门和疣微菌门主要分布于胃、小肠和粪便，放线菌门则主要分布在胃和小肠。野生川金丝猴胃肠道中的变形菌门主要来自假单胞菌属

124 (*Pseudomonas*) 的 4 个菌种[*Pseudomonas proteolytica*、*Pseudomonas cerasi*、无花果假单胞
 125 菌 (*Pseudomonas ficuserectae*) 和韦龙氏假单胞菌 (*Pseudomonas veronii*)]、埃希菌属
 126 (*Escherichia*) 的 2 个菌种[费格森埃希菌 (*Escherichia fergusonii*) 和大肠埃希杆菌
 127 (*Escherichia coli*)]和志贺菌属 (*Shigella*) 的宋内志贺菌 (*Shigella sonnei*)；厚壁菌门主要
 128 是来自梭菌属(*Clostridium*)的煎盘梭菌(*Clostridium sartagoforme*)、瘤胃球菌属(*Ruminococcus*)
 129 的扭链瘤胃球菌 (*Ruminococcus torques*)、梭杆菌属(*Fusobacterium*)的普氏梭杆菌
 130 (*Flavonifractor plautii*) 和肠球菌属(*Enterococcus*)的粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)。并且，
 131 与维持消化道黏膜屏障功能和防止肥胖相关代谢的嗜黏蛋白阿克曼氏菌 (*Akkermansia*
 132 *muciniphila*) 在胃、小肠、回肠和粪便中均有检测到。更重要的是，条带测序结果分析表明，
 133 在野生川金丝猴整个胃肠道中均检测到不可培养菌，说明其胃肠道中存在大量未被检测和鉴
 134 定的细菌种类。野生川金丝猴胃肠道菌群的系统发育树 (图 4) 表明，在 4 个不可培养菌中，
 135 仅条带 4 与已鉴定的粪肠球菌进化分类相似，说明条带 4 所代表的细菌可能是来自厚壁菌门
 136 的 1 株肠球菌；而其他不可培养菌与已知的菌种进化分支差异较大，这些菌种还需要进行深
 137 入的鉴定分析，同样说明在野生川金丝猴的胃肠道中有大量的菌群信息未被鉴定。

表 1 DGGE 图谱条带克隆测序和 BLAST 分析结果

Table 1 Sequencing and BLAST analysis results of bands DGGE profiles

条带 编号 Band NO.	GenBank 数据库中最相近的菌种 Closest relatives found in the GenBank database	登录号 Accession No.	相似性 Similarity/%	肠道部位 Location	菌门 Phylum
1	不可培养拟杆菌门细菌 Uncultured Bacteroidetes bacterium	GU958406.1	97	胃、十二指肠、空肠、粪便 Stomach, duodenum, jejunum and faeces	拟杆菌门 Bacteroidetes
2	不可培养菌 Uncultured bacterium	GU619482.1	99	胃、十二指肠、空肠 Stomach, duodenum and jejunum	
3	不可培养菌 Uncultured bacterium	GU198356.1	96	胃、十二指肠、空肠 Stomach, duodenum and jejunum	
4	不可培养菌 Uncultured bacterium	KC338352.1	98	胃、小肠 Stomach, small intestine	
5	<i>Pseudomonas proteolytica</i>	NR_025588.1	100	胃、十二指肠、空肠、粪便 Stomach, duodenum, jejunum and faeces	变形菌门 Proteobacteria
6	<i>Olsenella scatoligenes</i>	NR_134781.1	97	胃、十二指肠、空肠、粪便 Stomach, duodenum, jejunum and faeces	放线菌门 Actinobacteria
7	<i>Pseudomonas cerasi</i>	NR_146827.1	99	胃、十二指肠、空肠 Stomach, duodenum and jejunum	变形菌门 Proteobacteria
8	煎盘梭菌 <i>Clostridium sartagoforme</i>	NR_026490.1	99	大肠 Large intestine	厚壁菌门 Firmicutes

9	扭链瘤胃球菌 <i>Ruminococcus torques</i>	NR_036777.1	99	粪便 Faeces	厚壁菌门 Firmicutes
10	无花果假单胞菌 <i>Pseudomonas ficuserectae</i>	NR_040798.1	100	胃、十二指肠、空肠、粪便 Stomach, duodenum, jejunum and faeces	变形菌门 Proteobacteria
11	嗜黏蛋白阿克曼氏菌 <i>Akkermansia muciniphila</i>	NR_074436.1	99	胃、小肠、粪便 Stomach, small intestine and Faeces	疣微菌门 Verrucomicrobi a
12	普氏梭杆菌 <i>Flavonifractor plautii</i>	NR_043142.1	98	胃、小肠、粪便 Stomach, small intestine and Faeces	厚壁菌门 Firmicutes
13	韦龙氏假单胞菌 <i>Pseudomonas veronii</i>	NR_028706.1	100	粪便 Faeces	变形菌门 Proteobacteria
14	不可培养菌 Uncultured bacterium	FJ036720.1	100	胃、小肠 Stomach and small intestine	
15	费格森埃希菌 <i>Escherichia fergusonii</i>	NR_114079.1	100	胃肠道 Gastrointestinal tract	变形菌门 Proteobacteria
16	宋内志贺菌 <i>Shigella sonnei</i>	NR_104826.1	99	胃、小肠 Stomach and small intestine	变形菌门 Proteobacteria
17	大肠埃希杆菌 <i>Escherichia coli</i>	NR_112558.1	99	胃、十二指肠、空肠、粪便 Stomach, duodenum, jejunum and faeces	变形菌门 Proteobacteria
18	粪肠球菌 <i>Enterococcus faecalis</i>	NR_040789.1	99	胃、十二指肠、空肠、大肠、粪便 Stomach, duodenum, jejunum, large intestine and faeces	厚壁菌门 Firmicutes

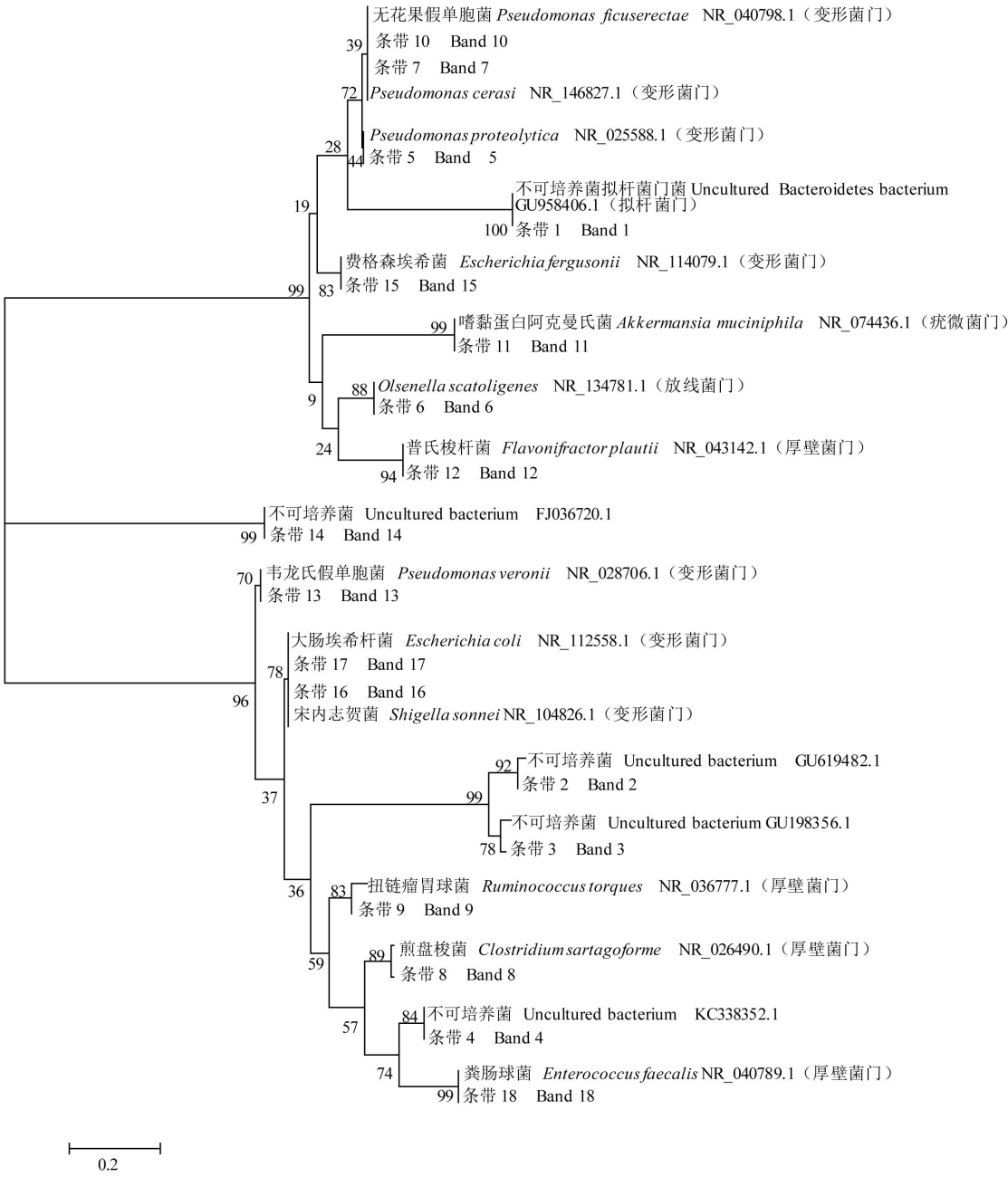


图 4 野生川金丝猴胃肠道菌群系统进化树

Fig.4 Phylogenetic tree of bacteria in gastrointestinal tract of wild *Rhinopithecus roxellanae*

3 讨论

野生动物是地球生物圈中宝贵的生物资源,近 40 年全球野生动物数量减少了 1/2^[11],其种群数量的下降不仅会加速物种的灭绝,并且会导致人畜共患疾病发生趋势的上升^[12]。研究表明,微生物的稳态平衡及多样性促进宿主健康生长^[13]。健康状态、环境、宿主基因型、饮食和性别不仅影响动物机体的生理功能,而且影响动物胃肠道菌群的结构及组成。尽管野生动物因保护特性而难以获得其胃肠道样品,但随着人们对野生动物种群保护的重视,死亡野

生动物胃肠道菌群信息已被陆续报道^[3,8]，这为其生存和保护提供了重要的基础资料。同样，本研究运用 PCR-DGGE 指纹图谱技术首次分析了 1 只死亡野生川金丝猴胃、小肠、大肠和粪便菌群的多样性，并对图谱中主要条带进行克隆测序及系统发育树分析，结果发现其胃肠道中栖息着大量菌群，不同肠段的菌群多样性有差异，且 DGGE 条带克隆测序鉴定出的菌群主要来自变形菌门，这些结果丰富了野生川金丝猴胃肠道菌群信息。

本研究中，PCR-DGGE 指纹图谱技术在分子水平上快速和直观地反映了野生川金丝猴胃肠道菌群的结构特点及多样性。图 1 表明野生川金丝猴胃肠道中栖息着大量的菌群，且克隆测序鉴定出的菌群主要来自变形菌门（38.89%）、厚壁菌门（22.22%）、拟杆菌门（5.56%）、放线菌门（5.56%）和疣微菌门（5.56%）。其中，变形菌门和厚壁菌门分布于整个胃肠道，但变形菌门是优势菌群。而在刘燕等^[8]的研究中，其采用 16S rRNA 的 Illumina MiSeq 测序技术检测了 1 只湖北神农架死于肺炎的半野生川金丝猴（雄性，20 岁）部分肠段（十二指肠段、小肠段、盲肠段及大肠段）样品，其菌群种类与本研究相同，但其丰度与本研究差异较大，其主要菌群来自厚壁菌门。同样，有研究者对北京动物园 1 只死亡健康雌性川金丝猴胃内容物的宏基因测序分析发现优势菌群来自厚壁菌门^[3]。产生这样的差异可能是因为研究的动物健康状态、环境、动物个体、性别、饮食及研究的方法均不同而导致。本研究是运用 PCR-DGGE 技术分析 1 只雌性可能死于心脏病的四川平武野生川金丝猴胃肠道菌群多样性。研究表明，变形菌门丰度的变化与动物健康状态密切相关，是导致动物个体间菌群结构及组成差异的主要菌群^[14]。且已有研究表明心脏衰竭的人粪便中来自变形菌门的埃希菌属的数量显著增加^[15]。同样，McKneey 等^[16]研究表明，健康恒河猴粪便菌群主要来自厚壁菌门，而患结肠炎恒河猴粪便中的优势菌群是弯曲菌属（来自变形菌门）。王剑等^[17]的研究同样表明，健康川金丝猴粪便中有更多的双歧杆菌（*Bifidobacterium* spp.）和乳酸菌（*Lactobacillus* spp.）等有益菌群，而腹泻川金丝猴的粪便中则出现较多的肠杆菌科（*Enterobacteriaceae*）和梭菌类群 I（*Clostridium* I）等病原菌。Aivelo 等^[18]研究了来自 71 只赤色倭蜂猴的 160 份样品，结果提示性别影响动物肠道菌群结构及组成。尽管本研究中的野生川金丝猴与 Zhou 等^[3]研究的川金丝猴性别均为雌性，但菌群信息仍然有差异，可能与研究的动物个体、胃肠道部位及研究方法均不同有关。与 Zhou 等^[3]研究中使用的能一次并行对成千上万条 DNA 分子进行序列测定的高通量测序技术相比^[19]，本研究中的 PCR-DGGE 技术主要用于简单、快速和直观地体现菌群的丰度及多样性^[10]。Zhou 等^[3]研究的是 1 只北京动物园圈养的川金丝猴，本试验研究的是 1 只野生川金丝猴，因此动物的生活环境和饮食均不同，而且有研究表明，圈养后的动物肠道菌群丢失严重^[20]。尽管如此，本研究与刘燕等^[8]和 Zhou 等^[3]的研究用不同

的微生物研究方法检测肠道菌群共同丰富了川金丝猴胃肠道菌群的信息。与本研究不同的是，在 Yildirim 等^[21]的研究中，厚壁菌门是黑白疣猴、红疣猴和红尾猴粪便的主要菌群。同样，厚壁菌门也是猕猴^[22]和叶猴^[23]粪便菌群的优势菌群，这些结果与本研究结果不同，可能是因为动物品种和动物健康状态不同而引起的。

野生川金丝猴胃肠道 DGGE 图谱条带的聚类分析（图 1）和主成分分析（图 3）结果表明，来自胃、小肠的样品聚为一簇，来自大肠的样品聚为一簇，而来自粪便的样品单独聚为一簇。动物胃肠道各部位除了共有的特征菌群，也存在因其不同的微环境及与生理功能相适应的特异性菌群^[24]，因此粪便菌群的研究结果不能完全反映动物胃肠道中菌群结构及组成。胃是动物初次处理和消化食物的部位，也是消化吸收营养物质的重要器官。尽管川金丝猴的胃因囊腔膨大且胃壁菲薄而不利于食物的机械磨碎，但其分泌胃酸的幽门部处于低位而使得胃酸不会影响处于高位的胃体和胃底的共栖微生物，而最终有利于对纤维素的分解和利用^[25]。川金丝猴是植食性灵长类动物，在其进化过程中有 69.7%快速进化嗅觉基因可能与水果和植物等气味相关，且其胃中的厚壁菌门与碳水化合物代谢密切相关^[3]。同样，在本研究中，厚壁菌门也是胃中的主要菌群，表明川金丝猴胃中菌群代谢与碳水化合物代谢有关。动物的小肠主要负责单糖代谢和氨基酸代谢，有利于变形菌门和乳杆菌目（*Lactobacillales*）细菌的生长^[26]。而大肠主要代谢复杂多糖，主要菌群来自拟杆菌门和梭菌目（*Clostridiales*）^[27]。川金丝猴的小肠长达 255 cm，大肠长度约为 182 cm。同样，本研究中 DGGE 图谱主要条带克隆测序结果表明，野生川金丝猴小肠菌群主要来自假单胞菌属的 *Pseudomonas proteolytica*、*Pseudomonas cerasi* 和无花果假单胞菌，埃希氏杆菌属的费格森埃希菌和大肠埃希菌，以及志贺菌属的宋内志贺菌，而这些菌属被报道是动物肠道或粪便中常见病原菌^[28-29]；而大肠中的主要菌群煎盘梭菌和粪肠球菌是动物消化道常见菌，尽管大多数粪肠球菌是有益菌，但含有基因 *Cassette*（毒力岛的一部分）的粪肠球菌是致病性菌种，危害动物健康^[30]。野生川金丝猴胃肠道中有病原菌的检出可能与动物的健康状态相关，本试验中的样品来自 1 只死于心脏病的野生老年川金丝猴，王剑等^[17]和简平等^[31]的研究均表明年龄和健康状态影响动物肠道菌群结构。

野生川金丝猴肠道菌群 PCR-DGGE 条带克隆测序结果显示其胃肠道中存在大量不可培养菌（表 1），且主要来自胃和小肠，说明其胃肠道中有大量菌群信息未被挖掘，这可能与川金丝猴动物本身的珍稀特性而使得对其胃肠道菌群的研究大多集中在易于采集的粪便样品。目前更新的菌群系统进化树结果显示，有大量不可培养菌与厚壁菌门聚类在一起^[32]。同样，在本研究中，野生川金丝猴胃肠道 DGGE 条带的系统进化树也表明（图 4）不可培养菌

大多来自厚壁菌门，主要是扭链瘤胃球菌、煎盘梭菌和粪肠球菌。赵晗旭等^[33]研究表明，厚壁菌门是 6 种野生动物的肠道优势菌群，瘤胃球菌属是单胃草食动物（袋鼠和大象）和反刍动物（长颈鹿和羊驼）肠道的差异菌群，该菌属在前者数量高于后者。同样，本研究结果显示厚壁菌门分布于野生川金丝猴整个胃肠道。因此，对厚壁菌门，特别是对瘤胃球菌属和粪肠球菌的研究可作为今后川金丝猴胃肠道菌群研究的重点关注方向。本试验运用 PCR-DGGE 技术首次分析了 1 只死于心脏病的老龄野生川金丝猴胃肠道菌群的多样性，其胃肠道菌群结构及组成代表了老龄死亡野生川金丝猴胃肠道的菌群特点，极大丰富了野生川金丝猴胃肠道菌群的信息。今后可借助宏基因组学技术对其菌群组成和功能进行深入分析，为野生川金丝猴的健康生长及种群保护提供指导。

4 结 论

本试验运用 PCR-DGGE 技术分析了 1 只老龄死亡野生川金丝猴胃肠道菌群多样性，获得了与其健康状态、性别、年龄和研究方法相适应的菌群特点，其菌群多样性随着胃肠道由前至后的顺序呈现高-低-高的趋势，且胃肠道菌群以变形菌门(38.89%)和厚壁菌门(22.22%)为主，但胃肠道中仍有大量不可培养菌(22.22%)有待深入研究。

参考文献：

- [1] 彭燕章,叶智彰,张耀平,等.金丝猴分类及系统发育关系[J].动物学研究,1988,9(3):239–248.
- [2] 全国强,谢家骅.金丝猴研究[M].上海:上海科技教育出版社,2002.
- [3] ZHOU X M,WANG B S,PAN Q,et al.Whole-genome sequencing of the snub-nosed monkey provides insights into folivory and evolutionary history[J].Nature Genetics,2014,46(12):1303–1310.
- [4] 金崑,刘世荣,顾志宏,等.我国川金丝猴的重要栖息地及自然保护区[C]//中国科协 2005 年学术年会.乌鲁木齐:中国林学会,2005.
- [5] STUMPF R M,GOMEZ A,AMATO K R,et al.Microbiomes,metagenomics,and primate conservation:new strategies,tools,and applications[J].Biological Conservation,2016,199:56–66.
- [6] PENNISI E.How do gut microbes help herbivores?Counting the ways[J].Science,2017,355(6322):236.
- [7] GEVAZA-TORSKY N,SEFIK E,KUA L,et al.Mining the human gut microbiota for immunomodulatory organisms[J].Cell,2017,168(5):928–943.
- [8] 刘燕,郑常明,李林海,等.一只半野生病死川金丝猴肠道微生物多样性分析[J].野生动物学报,2017,38(2):194–199.
- [9] 杨曼,兰阿峰,郭素芬,等.免培养法研究野生川金丝猴肠道内生细菌多样性[J].微生物学通报,2014,41(8):1605–1612.
- [10] MUYZER G,DE WAAL E C,UITTERLINDEN A G.Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain

- 246 reaction-amplified genes coding for 16S rRNA[J].Applied and Environmental
247 Microbiology,1993,59(3):695–700.
- 248 [11] VIGNIERI S. Vanishing fauna[J]. Science, 2014, 345(6195):392–395.
- 249 [12] YOUNG H S, DIRZO R, HELGEN K M, et al. Declines in large wildlife increase
250 landscape-level prevalence of rodent-borne disease in Africa[J]. Proceedings of the National
251 Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111(19):7036–7041.
- 252 [13] EVANS R, ALESSI A M, BIRD S, et al. Defining the functional traits that drive bacterial
253 decomposer community productivity[J]. ISME Journal, 2017, 11(7):1680–1687.
- 254 [14] BRADLEY P H, POLLARD K S. Proteobacteria explain significant functional variability in
255 the human gut microbiome[J]. Microbiome, 2017, 5(1):36.
- 256 [15] LUEDDE M, WINKLER T, HEINSEN F A, et al. Heart failure is associated with depletion of
257 core intestinal microbiota[J]. ESC Heart Failure, 2017, 4(3):282–290.
- 258 [16] MCKNNEY E A, RODRIGO A, YODER A D. Patterns of gut bacterial colonization in three
259 primate species[J]. PLoS One, 2015, 10(5):e0124618.
- 260 [17] 王剑, 王强, 曾东, 等. 健康和腹泻川金丝猴粪样菌群比较分析[J]. 中国兽医学
261 报, 2015, 35(8):1232–1238.
- 262 [18] AIVELO T, LAKKONEN J, JERNVALL J, et al. Population- and individual-level dynamics
263 of the intestinal microbiota of a small primate[J]. Applied and Environmental
264 Microbiology, 2016, 82(12):3537–3545.
- 265 [19] SCHUSTER S C. Next-generation sequencing transforms today's biology[J]. Nature
266 Methods, 2008, 5(1):16–18.
- 267 [20] KOHL K D, SKOPEC M M, DEARING M D. Captivity results in disparate loss of gut
268 microbial diversity in closely related hosts[J]. Conservation Physiology, 2014, 2(1):cou009.
- 269 [21] YILDIRIM S, YEOMAN C J, SIPOS M, et al. Characterization of the fecal microbiome from
270 non-human wild primates reveals species specific microbial communities[J]. PLoS
271 One, 2010, 5(11):e13963.
- 272 [22] SUN B H, WANG X, BERNSTEIN S, et al. Marked variation between winter and spring gut
273 microbiota in free-ranging Tibetan Macaques (*Macaca thibetana*)[J]. Science
274 Reports, 2016, 6:26035.
- 275 [23] HALE V L, TAN C L, NIU K F, et al. Diet versus phylogeny: a comparison of gut microbiota in
276 captive Colobine monkey species[J]. Microbial Ecology, 2017:1–13.
- 277 [24] TROPINI C, EARLE K A, HUANG K C, et al. The gut microbiome: connecting spatial
278 organization to function[J]. Cell Host & Microbe, 2017, 21(4):433–442.
- 279 [25] 陈嘉绩, 陆桐, 刘建遂, 等. 川金丝猴胃的观察[J]. 兽类学报, 1995, 15(3):176–180.
- 280 [26] GU S H, CHEN D D, ZHANG J N, et al. Bacterial community mapping of the mouse
281 gastrointestinal tract[J]. PLoS One, 2013, 8(10):e74957.
- 282 [27] SEEDORF H, GRIFFIN N W, RIDAURA V K, et al. Bacteria from diverse habitats colonize
283 and compete in the mouse gut[J]. Cell, 2014, 159(2):253–266.
- 284 [28] KATSOWICH N, ELBAZ N, PAL R R, et al. Host cell attachment elicits posttranscriptional
285 regulation in infecting enteropathogenic bacteria[J]. Science, 2017, 355(6326):735–739.
- 286 [29] 吕颜枝, 康永刚, 朱广琴, 等. 猕猴群暴发细菌性痢疾的诊治[J]. 畜牧与兽
287 医, 2012, 44(9):53–54.
- 288 [30] BAKSHI U, SARKAR M, PAUL S, et al. Assessment of virulence potential of uncharacterized
289 *Enterococcus faecalis* strains using pan genomic approach-Identification of pathogen-specific

and habitat- specific genes[J].Scientific Reports,2016,6:38648.

[31] 简平,王强,王剑,等.不同年龄段川金丝猴肠道菌群结构差异分析[J].动物营养学报,2015,27(4):1302–1309.

[32] HUG L A,BAKER B J,ANANTHARAMAN K,et al.A new view of the tree of life[J].Nature Microbiology,2016,1:16048.

[33] 赵晗旭.不同野生动物肠道微生物多样性分析及功能初步研究[D].硕士学位论文.长春:吉林农业大学,2015.

Bacteria Diversity in Gastrointestinal Tract of a Dead Wild *Rhinopithecus roxellanae* Analyzed by Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Technology ZENG Yan¹

NIU Lili^{2*} DENG Jiabo² WANG Qiang² YU Jianqiu² LI Yang¹ ZHOU Mengjia³ XU Shuai¹ LON Yiceng¹ ZENG Dong^{1**} NI Xueqin^{1**}

(1. *Institute of Animal Microecology College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China*; 2. *Chengdu Zoo, Chengdu 610081, China*; 3. *Sichuan Animal Science Institute, Chengdu 610066, China*)

Abstract: The aim of this experiment was to evaluate the bacteria diversity in gastrointestinal tract (GIT) of a dead wild *Rhinopithecus roxellanae*, and to analyze the phylogenetic tree of cloning sequencing bands. The GIT contents of a dead wild *Rhinopithecus roxellanae* were collected, and the polymerase chain reaction (PCR)-denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) technology with the cloning sequencing, cluster analysis and principal component analysis (PCA) of bands were used to detect the bacterial diversity and to build the phylogenetic tree. The results showed as follows: 1) numerous bacteria were obtained from the GIT of wild *Rhinopithecus roxellanae*. Samples from the stomach, duodenum, jejunum and ileum clustering together, samples from the cecum, colon and rectum clustering together, and samples from the faeces single clustering together. 2) The 18 identified DGGE bands were belong to five phylum, they were Proteobacteria (38.89%), Firmicutes (22.22%), Bacteroidetes (5.56%), Actinobacteria (5.56%), Verrucomicrobia (5.56%) and uncultured bacterium (22.22%). The Proteobacteria and Firmicutes were detected along the GIT. 3) The phylogenetic tree analysis showed that only one of uncultured bacterium was similar to the identified classification of *Enterococcus faecalis*, while the other three uncultured bacteria had a significant difference with the known branch of the bacteria. This

**Corresponding authors: ZENG Dong, professor, E-mail: zend@sicau.edu.cn; NI Xueqin, professor, E-mail: xueqinni@foxmail.com (责任编辑 营景颖)

320 indicated that a large number of flora information was unknown in the GIT of the wild
321 *Rhinopithecus roxellanae*. The results suggest that Proteobacteria is predominant in the GIT of a
322 dead wild *Rhinopithecus roxellanae*, and the bacteria diversity shows a tendency of high-low-high
323 according to the GIT from front to back.

324 Key words: *Rhinopithecus roxellanae*; gastrointestinal tract bacteria; PCR-DGGE; cloning
325 sequencing; phylogenetic tree

326

327